

氏 名	荻 原 琢 男
生 年 月 日	
本 籍	静岡県
学 位 の 種 類	博士(薬学)
学 位 記 番 号	博乙第208号
学位授与の日付	平成12年3月22日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	トランスポーターを介したモノカルボン酸の消化管吸収における基質認識および輸送特性の解析
論文審査委員(主査)	辻 彰(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	大熊 勝治(研究科・教授) 太田 富久(薬学部・教授) 横井 毅(薬学部・教授) 玉井 郁巳(研究科・助教授)

## 学 位 論 文 要 旨

The purpose of the present study is to confirm and to characterize the transporter-mediated absorption mechanism of monocarboxylic acids across the intestinal epithelial cells by examining the structural specificity of an anion exchange transporter, the stereoselectivity of the transcellular transport of several chiral monocarboxylic acids, and the fractal kinetic analysis.

The transport of several substrates was examined under various conditions using a monolayer of a human colonic adenocarcinoma cell line (Caco-2 cell), brush-border membrane vesicles and isolated tissue sheets of rat jejunum and rabbit ileum, gene products expressed in mammalian cells *in vitro*, and by analyzing the plasma concentration and the absorption ratio after administrations of substrates to the jejunum of rats *in situ*.

3-Hydroxycarboxylic acids unlike 2-, 4- or 5-hydroxycarboxylic acids, might not be substrates for an anion exchange transporter in the intestinal epithelial cells, suggesting a significance of the position of hydroxylation for the molecular recognition by the intestinal transports. 2-Hydroxymonocarboxylic acids such as L- and D-lactic acids were transported across the intestinal epithelial membranes, and were absorbed orally in a stereoselective manner by a specific transporter-mediated transport mechanism. Transporter-mediated absorption was well defined by fractal kinetics rather than classical kinetics which are ascribed by a combination of saturable transport obeying Michaelis-

Menten kinetics and unsaturable processes. Fractal kinetics is one of the important areas for understanding and confirming the properties of a transporter-mediated transport process. Therefore, it can be concluded that intestinal absorption of many nutrients and drugs proceed, at least in part, via the transporter-mediated mechanism, rather than by passive diffusion according to the pH-partition hypothesis.

## 1. はじめに

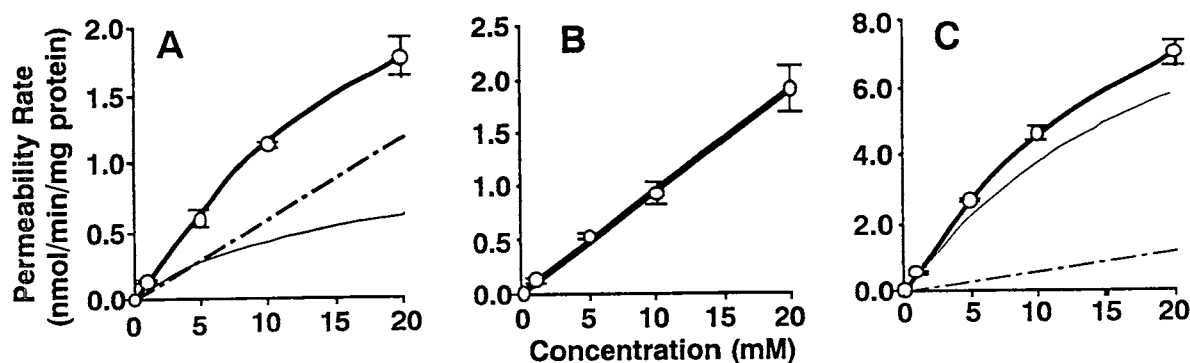
いままでに Tsuji, Tamai らは様々な手法を用い、酢酸や、ニコチン酸、安息香酸、サリチル酸などのモノカルボン酸の消化管吸収には、プロトン共輸送系、あるいはアニオン交換輸送系などのトランスポーターが関与していることを提唱してきた。これらの研究においてはトランスポーター介在輸送を証明する手段として、基質の取り込みにおけるオーバーシュート現象、イオン勾配などの輸送の駆動力、温度や濃度の依存性、代謝的阻害剤による影響、基質類似物質による競合的阻害、カウンタートランスポート現象、およびプロテアーゼや各種アミノ酸修飾剤による影響などが検討されている。また、近年ではこれらトランスポーター遺伝子をクローニングし、細胞の膜表面にトランスポーター蛋白を発現させた系を用い、その機能を解析する手法も検討されるようになった。これらの手段は物質の能動輸送の証明方法として繁用されているものではあるが、この一部はリポソームなどの人工膜を用いたカルボン酸の透過においても観察される現象であるなどの反論もあり、それぞれ単独では証明手段として不十分である。

そこで本研究において、未だにその消化管吸収においてトランスポーター介在輸送の関与について明確な結論がでていないモノカルボン酸を基質とし、消化管アニオン交換輸送系の基質認識性、立体選択的輸送特性、ならびにフラクタル理論による膜透過機構の速度論的解析を検討し、モノカルボン酸の消化管吸収においてトランスポーターが介在することの新たな立証と特性の解明を試みた。

## 2. 消化管アニオン交換輸送系の基質認識・輸送特性

先に Tamai らは、小腸上皮細胞刷子縁膜小胞や拡散チャンバーに装着した実験動物の消化管膜を用いた試験において、プラバスタチンや (*R*)-メバロン酸がその消化管吸収においてプロトン共輸送系には認識されるものの、アニオン交換輸送系の基質とはならない、あるいは極めてなりにくいことを報告した。これらのモノカルボン酸はカルボキシル基の3位および5位に水酸基をもつという共通の構造を有しており、この特徴がトランスポーターの基質認識性を制御している可能性が考えられた。そこで、ヒト消化管上皮細胞のモデルとして繁用されている Caco-2 培養細胞を用い、まず L-乳酸を基質としてアニオン交換輸送系を効率良く検出することが可能な系を確立し、さらに水酸基を有するモノカルボン酸の、特にカルボニル基と水酸基と位置関係に着目し、消化管吸収に関与するアニオン交換輸送系における基質の構造的特徴について検討した。

pH 勾配の無い、炭酸水素イオン勾配条件下で、L-乳酸の透過は単一の飽和性を示し、またアニオン交換輸送系の典型的な阻害剤である DIDS によって有意に阻害されたことから、この条件下でアニオン交換輸送系のみが比較的純粋に観察できるものと考えられた。またこの L-乳酸の透過は、2-, 4-および5-ヒドロキシモノカルボン酸によって阻害されたが、メバロン酸も含め3-ヒドロキシモノカルボン酸による阻害は認められなかった。さらに、カルボン酸に対して2位、3位あるいは4位に水酸基を有する酪酸を基質とし、それぞれの Caco-2 細胞の透過を観察したところ、2-あるいは4-ヒドロキシ酪酸は高濃度領域で透過速度が次第に頭打ちになる飽和性を示したのに対し、3-ヒドロキシ酪酸の透過速度は飽和性を示さなかった (Fig. 1)。また2-, あるいは4-ヒドロキシ酪酸の透過は DIDS によって阻害されたが、3-ヒドロキシ酪酸は阻害されなかった。これらの結果から、2-, あるいは4-ヒドロキシ、そしておそらく5-ヒドロキシモノカルボン酸はアニオン交換輸送系に基質として認識されるが、3-ヒドロキシモノカルボン酸はアニオン交換輸送系の基質になりにくく、3位の水酸基とトランスポーター蛋白との水素結合などを介した相互作用が基質認識性に重要であることが示唆された。



**Figure 1**  
**Concentration dependence of the transport of hydroxybutyric acids across Caco-2 cell monolayers.** 2-Hydroxybutyric acid (Panel A), 3- hydroxybutyric acid (Panel B) and 4- hydroxybutyric acid (Panel C) were examined. The lines represent the contribution of the saturable (—) and nonsaturable (---) components to the permeation. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments using the same culture of Caco-2 cells.

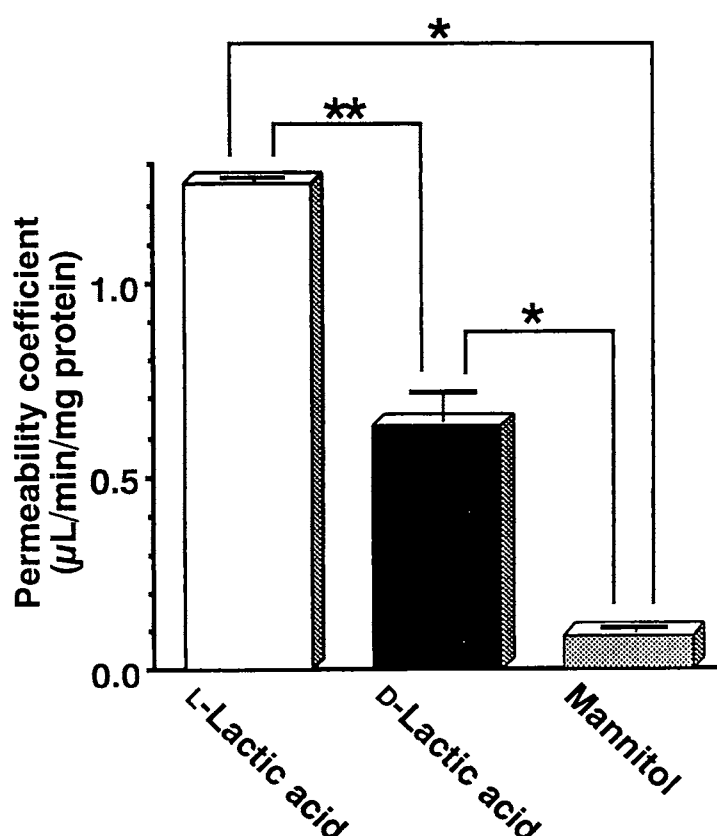
消化管吸収において、分子量や脂溶性、電荷、pKa 値などの物理化学的性質がほぼ同様な物質であれば受動輸送については同じような挙動を示すものと考えられるが、それにも関わらずヒドロキシ酪酸のように官能基の種類や位置のわずかな違いが消化管吸収に大きく影響する現象が観察されれば、そのことはトランスポーターが介在する膜透過の新たな証明のひとつになりうるものと考えられる。

### 3. モノカルボン酸の立体選択的輸送特性

薬物の薬理作用や毒性、さらには生体内動態において、光学異性体間で異なる挙動を示すことがしばしば観察されている。薬物の吸収に関与している消化管のトランスポーター蛋白は、薬物とレセプターの関係のように基質の光学異性を比較的厳密に区別することが期待され、光学異性体間で消化管吸収になんらかの差が認められればトランスポーターが介在する透過機構が存

在することのひとつの証明になり得るものと考えられる。そこで, Caco-2 細胞などを用い, L-およびD-乳酸を基質として選択しその消化管吸収における光学選択性について検討した。また, その他の光学活性なモノカルボン酸の透過についても検討し, 選択性を示すモノカルボン酸の構造上の特性について検討した。

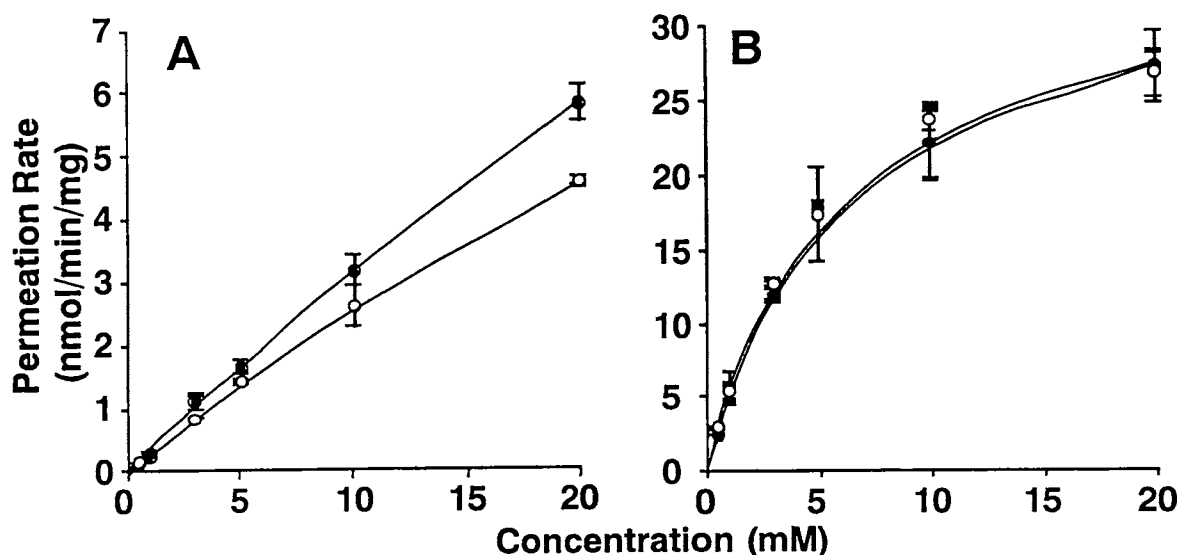
pH 勾配条件下における Caco-2 細胞を用いた L-および D- $[^{14}\text{C}]$ 乳酸の透過には, 明らかに立体選択性が認められ, 低濃度 ( $1\ \mu\text{M}$ ) では L-体の透過速度は D-体の約 2 倍の値を示した (Fig. 2)。濃度依存性の速度論的解析によって, L-乳酸の透過は D-体に比べて高親和性であり低容量であることが示された。このことは, 比較的低濃度領域においては L-乳酸の方が効率的に吸収され, 高濃度領域では D-体がより速く吸収されることを示唆している。



**Figure 2**  
**Permeability coefficient of L/D- $[^{14}\text{C}]$ lactic acids and  $[^3\text{H}]$ mannitol transport across Caco-2 cell monolayers.** Permeability of L/D- $[^{14}\text{C}]$ lactic acid ( $1\ \mu\text{M}$ ) and  $[^3\text{H}]$ mannitol ( $33\ \text{nM}$ ) were measured at  $37^\circ\text{C}$  by incubating Caco-2 monolayers in sodium-free HBSS buffer at an apical pH of 6.0 with a constant basolateral pH 7.4. Each column represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments.  
 \* Significantly different from the permeability coefficient of  $[^3\text{H}]$ mannitol transport by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).  
 \*\* Significant difference between isomers by Student's t-test ( $p < 0.05$ ).

Caco-2 細胞における L-乳酸の透過は, 2-ヒドロキシ, あるいは 2-アルコキシモノカルボン酸によって立体選択的に阻害され, しかもそのすべてにおいて乳酸の L-体に相当する (S)-体がより強い阻害作用を示したが, その他の光学活性なカルボン酸の阻害作用には立体選択性は観察されなかった。この現象は pH 勾配条件の無い, 炭酸水素イオン勾配のみの条件においても観察

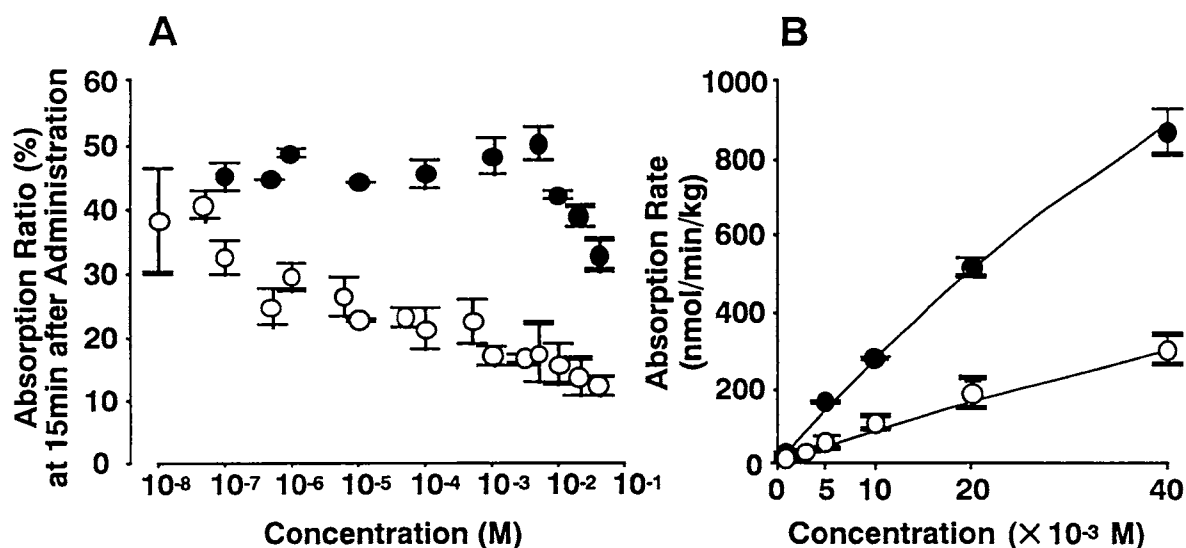
された。また、(S)-および(R)-マンデル酸自身を基質とした透過の検討においても光学選択性が観察されたが、(S)-および(R)-2-フェニルプロピオン酸の透過には立体選択性は認められなかった (Fig. 3)。これらの結果から、立体選択的な透過や阻害作用を示すためには、カルボン酸の2位に水酸基、あるいはアルコキシ基を有することが必須であることが示唆され、また(S)-体のほうが(R)-体よりもトランスポーターに対する親和性が高いことが示された。水酸基の酸素原子は水素結合などを介して他の分子の水素原子と相互作用することが知られており、モノカルボン酸の2位の水酸基がトランスポーター蛋白と相互作用することにより、光学選択的な輸送特性を示すものと考えられた。



**Figure 3**  
Concentration dependence of transport of (S)- (●) and (R)- (○) isomers of mandelic acid (Panel A) and 2-phenylpropionic acid (Panel B) transports across Caco-2 cell monolayers. Permeation of each compound (from 0.5 to 20 mM) was measured at 37 °C by incubating Caco-2 cells in HBSS buffer (at apical pH 6.0 and at basolateral pH 7.4). Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments.

ラットおよびウサギの小腸組織を用いた試験では、Caco-2細胞を用いた検討と同様にトレーサーレベルのL-乳酸の透過速度はD-体よりも高かった。また、ラット in situ ループ法を用いた試験において、様々な濃度の乳酸をループ内に注入し15分後の吸収率を速度論的に解析した。その結果、L-およびD-乳酸の輸送特性には飽和性と非飽和性のコンポーネントが存在し、飽和性を示す過程のKt値はCaco-2細胞を用いた光学選択的な輸送の検討とほぼ同様な結果が得られ、L-乳酸はD-体にくらべ高親和性であり、かつ低容量であることがin situにおいても示された (Fig. 4)。このin situ ループ法におけるL-乳酸の吸収率は、投与薬液のpHを高くすることや代謝阻害剤、DIDSの添加によって有意に阻害され、in situの条件においてもプロトン勾配と炭酸水素イオン勾配を駆動力とする少なくとも2種類のトランスポーターが吸収に関与している可能性が示唆された。またin situの検討においてもCaco-2における検討と同様に、L-乳酸の吸収率はL-/D-乳酸および(S)/(R)-マンデル酸のような2-ヒドロキシカルボン酸によって立体選択的に阻害されたが、(S)/(R)-2-フェニルプロピオン酸の阻害においては、選択性

は認められなかった。このように、消化管吸収における立体選択性の検討や、さらにその光学選択性を示す基質の構造的特徴を明らかにすることは、トランスポーター介在型の透過機構が存在することのひとつの証明になり得るものである。また *in situ* ループ法を用いた検討によってもトランスポーターが介在する吸収過程を観察することは可能であり、おそらく *in vivo* の環境においても、モノカルボン酸の消化管吸収には日常的にトランスポーターが寄与しているものと思われる。



**Figure 4**  
Concentration dependence of the absorption ratio at 15 min after administration (Panel A) and the initial absorption rate (Panel B) of *L/D*-lactic acids in the dosing concentration from 10<sup>-8</sup> M of *L*-isomer (○), and 10<sup>-7</sup> M of *D*-isomer (●) to 40 × 10<sup>-3</sup> M. Each point represents the mean ± S.E.M. of three experiments.

#### 4. フラクタル理論によるトランスポーター介在型膜透過機構の解析

トランスポーターが介在する輸送系の濃度依存性を検討した際、従来の速度論的解析には、従来よりいわゆるミカエリス-メンテンの式と非飽和の吸収過程の和として表わす手法が用いられてきた(式1)。この際に非飽和過程の寄与がトランスポーター介在輸送よりもはるかに大きい場合、トランスポーター介在の寄与が非飽和の項に隠されてしまい、トランスポーターが介在する輸送特性の解析を困難なものにしてきた。

最近 Macheras は、従来の解析方法に代わりフラクタル理論を応用した新たな解析方法を提案した。この理論によると、トランスポーター介在の膜透過は非飽和過程の項を含めなくても、解析することが可能である。すなわちトランスポーターが介在する輸送は、例えば攪拌によって膜のおかれた環境を制御することによりフラクタル次元が増加すると、特に基質の高濃度領域では透過速度が減少する現象が観察されると考えられる(式2)。

$$J = J_{\max} \times S / (Kt + S) + k_d \times S \quad (1)$$

S : 基質濃度, J<sub>max</sub> : トランスポーター介在輸送における最大輸送速度

K<sub>t</sub> : ミカエリス定数に相当する 2 分の 1 飽和濃度

k<sub>d</sub> : 受動輸送における 1 次の速度定数

$$J = J^{\text{eff}}_{\text{max}} \times (S)^{2-D} / (K_t^{\text{eff}} + S) \quad (2)$$

J<sup>eff</sup><sub>max</sub> : トランスポーター介在輸送における有効最大輸送速度 (effective maximum transport rate)

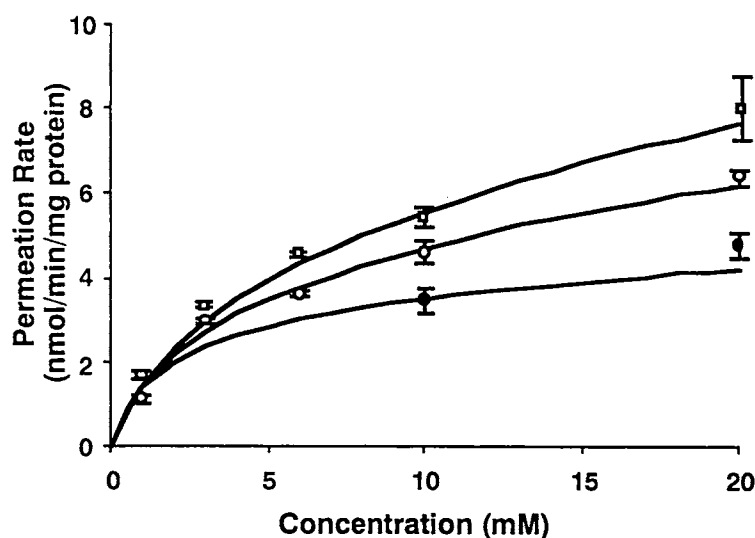
K<sub>t</sub><sup>eff</sup> : 有効 2 分の 1 飽和濃度 (effective half-concentration)

D : フラクタル次元

そこで、まずすでにトランスポーターを介して消化管を輸送されることが知られている基質を用い、拡散チャンバーに装着した Caco-2 細胞を用いて様々な攪拌条件における透過速度を測定して Macheras が提唱した理論を実験的に証明した。次いで L-乳酸および安息香酸を基質とし、フラクタル理論によるトランスポーターが介在する膜透過機構の解析を行った。

トランスポーターを介して消化管吸収することが知られているフェニルアラニンやセフラジンの Caco-2 細胞を用いた検討において、系内の攪拌速度上昇に伴い刷子縁膜側から側底膜側への透過速度は減少した。また、3-O-メチル-D-グルコースの場合にはある一定の攪拌速度において透過速度が極大値を示した。これは、攪拌操作はフラクタル次元を制御しトランスポーター輸送における透過速度を減少させる一方で、非攪拌水層を薄くすることによりその透過時間を短くし、透過速度全体を上昇させる方向に寄与するものと考えられ、トランスポーター輸送においてはこれら相反するモードが寄与し、極大値を示す現象が観察される場合があるものと考えられた。一方細胞間隙ルートのマーカーであるマンニトールを基質とした場合には、透過速度は攪拌速度によって影響されず、細胞内を受動輸送によって透過するアンチピリンを用いた場合には攪拌速度の上昇に伴い透過速度は上昇した。これらの結果から、トランスポーターを介した透過過程において、系内の攪拌速度を増してフラクタル次元を増加させる方向に操作すると透過速度が減少したり、一定の攪拌速度において極大値を示すという特有な現象が観察され、トランスポーターが介在する透過過程にフラクタル理論を応用した解析が適用できることが示された。

L-乳酸の Caco-2 細胞の刷子縁膜側から側底膜側への透過速度は、系内の攪拌速度上昇に伴い減少した (Fig. 5)。安息香酸の場合は、3-O-メチル-D-グルコースと同様に一定の攪拌速度の場合に透過速度が極大値を示し、これらのいずれのモノカルボン酸もトランスポーターが介在する透過過程特有の現象を示した。これらの結果から、モノカルボン酸の消化管吸収にトランスポーターが関与していることを、フラクタル理論を応用した解析方法によっても示すことが可能であることが証明された。



**Figure 5**  
**Concentration dependence of L-lactic acid transport across Caco-2 monolayers in several agitation conditions of 0 (□), 15 (○), and 45 ml/min (●).** Permeability of L-[<sup>14</sup>C]lactic acid (from 1 to 20 mM) was measured at 37 °C and by incubating Caco-2 monolayers in sodium-free HBSS buffer (at apical pH 6.0 and at basolateral pH 7.4). Each point represents the mean ± S.E.M. of three experiments. The solid lines were fitted by Eq. (2) using  $J_{\max}^{\text{eff}} = 2.17$  nmol/min/mg protein and  $K_t^{\text{eff}} = 0.5$  mM, the values of D from top to bottom are 0.57, 0.64 and 0.77 at the agitation rates of 0, 15 and 45 ml/min, respectively.

## 5. 結論

今回の一連の研究結果から、基質の構造的特性の検討、基質の立体選択性の検討、ならびにフラクタル理論による輸送特性の解析もトランスポーターが介在する膜透過機構の新たな証明のひとつであり、このような手法がトランスポーター介在輸送の特性を理解し、確認する上で重要なアプローチになりえるものと考えられた。生体成分や栄養物、さらには薬物の消化管吸収においては、従来より示されてきた pH 分配仮説で説明される受動輸送の寄与もさることながら、これらのトランスポーターが介在する吸収の寄与も無視できず、むしろより優位である可能性も考えられ、今後、これらの輸送系を積極的に利用することによって消化管吸収の効率性や特異性を高めた、いわゆる“構造式の中にインテリジェンスをもつ”経口投与医薬品の開発研究が期待される。



## 学位論文審査結果の要旨

当該論文に対して、面接審査を行うとともに、平成11年12月1日の口頭発表における質疑応答の結果を踏まえ、協議の結果、次の通り判定した。

モノカルボン酸の消化管吸収には、プロトン共輸送系、あるいはアニオン交換輸送系などのトランスポーターが関与していることが報告されているが、いずれの機構が主として機能しているか、あるいはpH分配仮説に従う受動拡散機構による吸収の寄与については依然として不明であった。

そこで本研究では、モノカルボン酸を基質としてヒト消化管上皮細胞Caco-2、ラット小腸in situループ法、小腸組織切片などを用いた透過性の速度論的解析から、消化管におけるプロトン共輸送系およびアニオン交換輸送系の基質認識性、立体選択的輸送特性に関して以下に示す結果を得た。

1. モノカルボン酸における3位の水酸基とトランスポーター蛋白との水素結合を介した相互作用がアニオン交換輸送系の基質認識性に重要である。
2. 光学異性体を持つ各種モノカルボン酸には立体選択的輸送があり、プロトン勾配と重炭酸イオン勾配を駆動力とする少なくとも2種類のトランスポーターがこれらの消化管吸収に関与する。
3. モノカルボン酸の小腸上皮近傍の攪拌速度に依存して変化する吸収速度のフラクタル理論による速度論的解析結果はトランスポーター介在輸送を支持する。

以上の研究成果により、モノカルボン酸系化合物のpH依存的な消化管吸収は、独立して機能するプロトン共輸送系およびアニオン交換輸送系を介した輸送に基づくものであることが明らかとなった。本研究成果は、薬物経口デリバリーの開発に寄与すると思われ、博士(薬学)論文に値すると認める。